

Aus dem Institut für Bakteriologie und Immunologie
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Professor Dr. H. Blobel

**Charakterisierung von Pasteurella Multocida-
Proteinen mit der
Polyacrylamidgel-Disk-Elektrophorese**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Laoualy Adamou
Tierarzt aus Kantché/Niger

Gießen 1971



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545931_0034

Aus dem Institut für Bakteriologie und Immunologie
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Professor Dr. H. Blobel

**Charakterisierung von Pasteurella Multocida-
Proteinen mit der
Polyacrylamidgel-Disk-Elektrophorese**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Laoualy Adamou
Tierarzt aus Kantché/Niger

Gießen 1971

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen
Fakultät in Gießen

Dekan: Professor Dr. G. Lämmle

Berichterstatter: Professor Dr. H. Blobel



Tag der mündlichen Prüfung: 1.-2. Juli 1971

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1.0 Einleitung	1
2.0 Literaturübersicht	3
2.1 Kulturelle und biochemische Differenzierung von <u>P. multocida</u>	3
2.2 Serologische Differenzierung von <u>P. multocida</u>	3
2.3 Diskelektrophoretische Analyse	6
3.0 Material und Methoden	8
3.1 Material	8
3.11 <u>P. multocida</u> -Kulturen	8
3.12 Medien	8
3.2 Methoden	8
3.21 Identifizierung von <u>P. multocida</u>	8
3.22 Auswahl eines geeigneten Mediums	13
3.23 Züchtung von <u>P. multocida</u>	14
3.24 Wachstumskurve	15
3.25 Reinheitskontrolle der Kulturen	16
3.26 Gewinnung der <u>P. multocida</u> -Proteinfraktionen	16

3.261 Metaphosphorsäure	
(HPO ₃) _n - Fällung	18
3.262 Salzsäure (HCl) - Fällung	18
3.263 Proteinbestimmung	19
3.27 Vertikale Polyacrylamidgel-Disk-	
Elektrophorese	19
3.271 Disk-Elektrophorese-	
Stammlösungen	19
3.272 Apparaturen	21
3.273 Herstellung der Gelsäulchen	24
3.274 Ablauf der Disk-Elektrophorese	25
3.275 Färbung und Entfärbung der	
Gelsäulchen	26
3.276 Auswertung der Banden	27
4.0 Ergebnisse	28
4.1 Identifizierung der <u>P. multocida</u> -Stämme	28
4.2 Medien-Vergleich	28
4.3 Bakterienwachstum	28
4.4 Säure-Fällung	30
4.5 Diskelektrophoretische Auswertung	
von <u>P. multocida</u> -Protein	30

4.6 Reproduzierbarkeit der Diskelektrophorese	
Ergebnisse	31
4.7 Weitere Kombinationstypen	32
4.8 Vergleich der diskelektrophoretischen	
Analyse mit serologischen Typisierungs-	
ergebnissen	32
5.0 Diskussion	41
6.0 Zusammenfassung	47
Literaturverzeichnis	48
Anhang	
Lebenslauf	

1.0 Einleitung

Die Pasteurellosen sind weltweit verbreitet. Die durch sie hervorgerufenen hämorrhagischen Septikämien führten zu großen wirtschaftlichen Verlusten. Um diese zu verhindern, wäre die Entwicklung einer wirksamen Vakzine angezeigt. Dafür wäre wiederum eine genaue Kenntnis der Antigenstruktur von Pasteurella multocida (P.multocida) notwendig. Obwohl diesbezüglich Untersuchungen bereits durchgeführt worden sind (CARTER und ANNAU⁸, BAIN³, KNOX und BAIN²², PRINCE und SMITH³³), ist unser Wissen über die Antigenstruktur von P.multocida noch im Anfangsstadium.

Zur Serotypie von P.multocida-Stämmen wurden bisher 2 Methoden angewandt. Eine davon war der von ROBERTS³⁴ beschriebene Mäuseschutztest. Mit dieser Methode konnten allerdings nur Pasteurellen typisiert werden, die für Mäuse pathogen waren. Die andere Methode war der indirekte Hämagglutinationstest nach CARTER⁹. Hierbei wurden die Polysaccharide der Kapsel erfaßt. Pasteurellen die keine Kapsel aufwiesen, konnten deshalb nicht typisiert werden. Außerdem empfahl CARTER⁹ für den indirekten

Hämagglutinationstest menschliche Erythrozyten der Blutgruppe O, die aber für die Routineuntersuchung nicht immer ohne weiteres zur Verfügung stehen. Eine weitere Methode zur Analyse der Antigenstruktur von P.multocida wurde kürzlich von BRÜCKLER, BAXI und BLOBEL⁶ entwickelt. Sie bestand darin, P.multocida-Proteine mit Hilfe der Polyacrylamidgel-Disk-Elektrophorese darzustellen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun, diese Methode für die Typendifferenzierung von P.multocida auszuweiten.

2.0 Literaturübersicht

2.1 Kulturelle und biochemische Differenzierung von P. multocida

Aufgrund kultureller und biochemischer Reaktionen differenzierten zunächst ROSENBUSCH und MERCHANT³⁵, und SMITH³⁹ Stämme von P. multocida.

ROSENBUSCH und MERCHANT³⁵ untersuchten bei Pasteurellen die Wachstumsform und die Hämolyse, die Fähigkeit der Spaltung von 22 Kohlenstoff-Quellen (darunter Zucker und Alkohole wie z.B. Xylose, Arabinose und Dulcit), die Indolbildung, Nitratreduktion und die Gallensäurelöslichkeit. Hierbei teilten sie die Pasteurellen in 3 Gruppen, I, II, III.

SMITH³⁷ differenzierte die Pasteurellen von verschiedenen Tierarten nach ihrer Kapselbildung, ihrer Kolonieform und nach ihrer Hyaluronsäurebildung. Diese Differenzierungsmethoden erwiesen sich jedoch bald als unzulänglich.

2.2 Serologische Differenzierung von P. multocida

Die serologische Typisierung wurde 1937 von LITTLE und LYON²⁴ mit dem Objektträger-Agglutinationstest

vorgenommen. Diese Autoren konnten P. multocida-Stämme in 3 Gruppen (1, 2 und 3) einteilen. ROBERTS⁵⁴ untersuchte 1947 57 P. multocida-Kulturen im Mäuseschutztest und differenzierte 4 Typen, nämlich I, II, III und IV. HUDSON¹⁹ führte die Arbeiten von ROBERTS⁵⁴ fort und fügte den Typ V zu den schon bekannten 4 Typen hinzu. Typ VI wurde später von ALFONSO et al.¹ beschrieben. OCHII³⁰ teilte die P. multocida-Stämme mit Hilfe des Röhrchen-Agglutinationstestes in 4 Gruppen (A, B, C und D) ein. CARTER¹⁰ fand weder den Objektträger-, noch den Röhrchen-Agglutinationstest für die serologische Typisierung von P. multocida-Stämmen geeignet. CARTER und BYRNE¹¹ teilten 68 P. multocida-Stämme mit Hilfe der Präzipitation und der Kapselschwellungsreaktion in 5 Typen ein, nämlich A, B und C. Es wurden dabei "Kapsel"-Antigene nachgewiesen. Im indirekten Hämagglutinationstest konnte CARTER⁹ 122 P. multocida-Stämme in 4 Typen differenzieren, A, B, C und D. PERREAU³¹ und CARTER¹² entdeckten später einen weiteren Typ, den Typ E. In einer späteren Arbeit schlug CARTER¹³ vor, den Typ C zu streichen, da er anscheinend keine Bedeutung mehr hatte. NAMIOKA und MURATA^{27,28} und NAMIOKA und BRUNER²⁹ führten mit Salzsäure behandelten Antigenextrakt und (somatischen) O-

Gruppen Faktorenantisera den Agglutinations- und Agglutinationsabsorptionstest durch. Unter 156 untersuchten P. multocida-Stämmen fanden sie 10 O-Gruppen. KAWEH et al.²⁰ prüften 20 P. multocida-Stämme mit dem Mäuseschutztest und dem Hämagglutinationstest. 15 Stämme wurden als ROBERTS'³⁷ Typ I, CARTER Typ B, 1 Stamm als ROBERTS'³⁴ Typ II und 2 als ROBERTS'³⁴ Typ III klassifiziert. Zwei Stämme konnten nicht typisiert werden. Die übereinstimmenden Serotypen wurden übersichtshalber in Tabelle 1 zusammengefaßt.

BAIN³ befaßte sich bereits 1955 mit P. multocida-Proteinen. Es gelang ihm 1963 auf Ouchterlony-Platten mindestens 4 Präzipitationslinien darzustellen. PRINCE und SMITH³³ beschrieben 1966 18 lösliche Antigene von P. multocida, die sie mit Hilfe der Immunelektrophorese darstellten. Sie stellten außerdem fest, daß die Kapselantigene aus einem Polysaccharid-Protein-Komplex bestanden und einige der somatischen Antigene Proteine waren, die aber nicht isoliert werden konnten. Gereinigte Proteinfaktoren (BAIN³ 1955, DHANDA¹⁸ 1960) wurden mit Erfolg zur aktiven Immunisierung von Mäusen, Rindern und Büffeln gegen Pasteurellosen benutzt.

2.3 Diskelektrophoretische Analyse

Eine weitgehende reproduzierbare Charakterisierung der P. multocida-Proteine war durch die Polyacrylamidgel-Disk-Elektrophorese möglich (BRÜCKLER, BAXI und BLOBEL⁶). Mit dieser Methode untersuchten die Autoren P. multocida-Proteine von 28 Stämmen der serologischen Typen A, B, C, D und E. Sie fanden bei allen Stämmen eine Anzahl markanter Proteinbanden, die hauptsächlich im mittleren Wanderungsbereich bei 62, 60, 54, 49, 42 und 37 vorkamen. Diese Banden kamen in 4 Kombinationen I, II, III und IV vor. Weitere Proteinbanden traten zwischen 87 und 85, zwischen 28 und 30 und zwischen 25 und 27 auf. Alle untersuchten Stämme hatten die Banden 60 und 54.

Tabelle 1:

Übereinstimmung serologischer Typen von P. multocida

Autoren	Methoden	übereinstimmende Typen
Rosenbusch u. Merchant 1937	Röhrchen Agglutination	I* II
Little u. Lyon 1943	Objektträger Agglutination	1 2 3
Roberts 1947	Mäuseschutztest	II I IV III
Ochii 1952	Röhrchen Agglutination	A B D C
Carter 1955	indirekte Hämagglutination	A B D C

* untereinander geordnet

3.0 Material und Methoden

3.1 Material

3.11 P. multocida-Kulturen

Es wurden 92 Kulturen untersucht, deren Herkunft in Tabelle 2 angegeben ist.

3.12 Medien

Als feste Medien wurden Schafblutagar⁴ und Trypticaseagar (1)⁴ verwandt, als flüssige Medien das LO₃-Medium (2)³⁹, Brucella Broth (BB) (3) und Heart Infusion Broth (HIB) (4) verwandt. Die kommerziellen dehydrierten Medien wurden nach den Vorschriften der Hersteller zubereitet.

3.2 Methoden

3.21 Identifizierung von P. multocida

Die lyophilisierten Keime wurden auf Schafblutagarplatten überimpft, 24 Std. bei 37°C bebrütet und dann wie folgt identifiziert^{38,20}:

-
- (1) Yeast-trypticase Agar mit 0,1% Zuckerzusatz
 - (2) Casein Casein-Yeast Medium,
modifiziert nach WENK³⁹
 - (3) Albimi Laboratories, New-York, USA
 - (4) Difco Laboratories, Detroit, USA

- a) Morphologie nach Gram-Färbung,
- b) Indolbildung³⁸,
- c) Reaktion in Lackmus-Milch³⁸,
- d) Methylrot-Reaktion³⁸,
- e) Gelatine-Verflüssigung³⁸,
- f) Vergärung von Glucose, Saccharose, Laktose, Galactose, Dulcit, Adonit, Mannit und Xylose, jeweils in 1%iger Konzentration in Peptonwasser (1).

(1) E. Merck, Darmstadt (0,2 % Na-Phosphat + 0,3 % NaCl + 1 % Pepton + H₂O ad 100 ml)

Tabelle 2:

Herkunft der P. multocida-Stämme

Stamm Nr.	Tierart [*]	Land	Typ nach Carter
1	Kaninchen	Frankreich	A
2	Rind	Indien (Impf- stamm)	B
3	Hund	USA	C
4	Schwein-Pneumonie	Japan	D
5	Rind	Kongo	E
7	Schwein-Pneumonie	Frankreich	A
8	Geflügelcholera	Vietnam	A
9	Rinderseptikämie	Phillipinen	A
10	Geflügelcholera	USA	A
11	Rinderseptikämie	Kongo	E
12	Rind-Wunde	Australien	B
14	Schaf-Pneumonie	Kenia	NT ^{**}
15	Rind-Pneumonie	Phillipinen	"
16	Schwein	Polen	"
17	Rind	Afrika	"
18	Geflügelcholera	CSR	"
21	Rind	Polen	"
22	Mensch	CSR	"
23	Gans	Japan	"
24	Ratte	Kenia	"
25	Pferd	Polen	"
26	Geflügelcholera	Formosa	"
27	Geflügelcholera	Vietnam	"
29	Katze	Japan	"

* mit Krankheiten, wo bekannt

** nicht typisiert

Fortsetzung Tabelle 2:

30	Eichhörnchen	USA	NT**
31	Schwein-Pneumonie	Formosa	"
33	Geflügelcholera	CSR	"
34	Schaf	USA	"
35	Rind	Nigeria	"
36	Geflügelcholera	Polen	"
37	Geflügelcholera	Burma	"
39	Ochse-Mäusepassage	-	A
40	Büffel	-	B
41	Geflügelcholera	Pakistan	A
42	Kaninchen	Deutschland	A
44	Schaf	Frankreich	A
45	Ziege	"	A
46	Hammel	"	A
47	Schwein-Pneumonie	"	A
48	Schwein-Pneumonie	"	A
49	Geflügel (CRD)	"	A
51	Geflügel-Coryza	"	A
52	Hase	"	A
53	Hase	"	A
54	Schwein-Pneumonie	"	A
56	Ziege-Pneumonie	"	D
57	Hase-Pneumonie	"	D
58	Schwein-Pneumonie	"	D
59	Schwein-Pneumonie	"	D
61	Pferdwindinfektion	"	D
63	Geflügelcholera	"	D
64	Rind	"	D
65	Ziege-Pneumonie	"	D
67	Schaf	"	A

** nicht typisiert

Fortsetzung Tabelle 2:

68	Ente-Pneumonie	Frankreich	A
69	Hase	"	D
70	Geflügel	"	D
71	Büffel	Kambodscha	B
72	Büffel	Kambodscha	B
73	Zebu	Kamerun	E
74	Zebu	Senegal	E
75	Kaninchen	Deutschland	NT **
76	Kaninchen	Deutschland	"
77	Darmwunde Mensch	USA	"
78	Hundebißwunde Mensch	USA	"
79	Halsabstrich Mensch	USA	"
80	Sputum Mensch	USA	"
81	1843-65 Mensch	USA	"
82	1170-66 Mensch	USA	"
83	2557-67 Mensch	USA	"
84	2880-66 Mensch	USA	"
85	Bussard		"
86	2611		"
87	2557		"
89	P 61		"
90	S 573		"
92	2/134		"
93	196/64		"
94	Poona		"
95	Sp 134		"
96	39 Bu		"
97	39 Bx		"

** nicht typisiert

Fortsetzung Tabelle 2:

98	Schwein-Pneumonie	Frankreich	A
99	Schaf	England	NT**
100	Kaninchen	BDR(Tierhygiene)	"
101	239/57	BDR(Geflügelabt.)	"
102	931/62	"	"
103	5162	"	"
105	"Freihug"	"	"
106	Meerschweinchen	BDR(Tierhygiene)	"
108	Schwein	"	"
110	Rind		

3.22 Auswahl eines geeigneten Mediums

Brucella Broth (BB) (1) und LO₃-Medium (2)³⁹ wurden auf ihr Vermögen, maximales Wachstum zu fördern, geprüft. Zur Bereitung der Vorkultur wurde eine P. multocida-Kolonie nach 24stündiger Bebrütung bei 37°C auf Schafblutagar⁴ in 20 ml Heart Infusion Broth (HIB) (3) in 200-ml-Kolben suspendiert und 24 Std. bei 37°C auf einer Rundschüttelmaschine (70 U/Min.) (4) geschüttelt. Von der Vorkultur wurden 0,4 ml jeweils in 13 200-ml-Kolben mit je

** nicht typisiert

(1) Albimi Laboratories, New York, USA

(2) Casein Casein-Yeast - Medium modifiziert nach WENK³⁹

(3) Difco Laboratories, Detroit, USA

(4) Modell RC₄ der Firma Kuhne, Basel

20 ml BB und in 13 200-ml-Kolben mit je 20 ml L0₃-Medium (1) überimpft und im Brutraum bei 37°C 24 Std. geschüttelt (2). Das Bakterienwachstum wurde alle 2 Std. spektralphotometrisch (3) bei 525 nm gemessen. Die Absorption eines unbeimpften, aber ebenso lang bebrüteten Mediums wurde gleich 100 gesetzt. Das unbeimpfte Medium diente gleichzeitig zur Kontrolle auf Sterilität des Mediums. Der Medien-Vergleich wurde mit 14 P. multocida-Stämmen durchgeführt.

3.23 Züchtung von P. multocida

Vor jeder Beimpfung wurden zur Kontrolle auf Sterilität des Mediums alle Kolben über Nacht bei 37°C inkubiert.

Vorkultur:

Von jedem Stamm wurden 1 - 2 Kolonien in 20 ml HIB suspendiert und 24 Std. bei 37°C auf einer Rundschüttelmaschine (70 U/Min.) bebrütet.

Hauptkultur:

Zwei 2-Liter-Erlenmeyerkolben, die jeweils 250 ml BB enthielten wurden mit je 5 ml Vorkultur beimpft

(1) Casein Casein-Yeast - Medium modifiziert nach WENK³⁹

(2) Modell RC₄ der Firma Kuhne, Basel

(3) Spectronic 20, Bausch and Lomb

und 72 Std. bei 37°C unter ständigem Schütteln (70 U/Min.) bebrütet. Ein unbeimpfter Kolben wurde für die spätere elektrophoretische Analyse hinzugefügt.

3.24 Wachstumskurve

Fünfzehn 200-ml-Kolben die je 20 ml BB enthielten, wurden mit 0,4 ml einer 24 Std. alten HIB-Vorkultur von P. multocida Stamm 7 beimpft und 72 Std. bei 37°C auf einer Schüttelmaschine (70 U/Min.) bebrütet. Während der ersten 24 Std. wurde die Keimdichte in Abständen von 2 Std. im Spektralphotometer (1) bei 525 nm bestimmt und parallel hierzu eine kulturelle Bakterienzählung³⁸ vorgenommen. Zwischen 24 - 48 Std. wurde 8-stündlich gemessen und zwischen 48 - 72 Std. 12-stündlich. Zur kulturellen Bakterienzählung wurde 1 ml Bakteriensuspension zu 9 ml steriler 0,14 M NaCl gegeben und eine Verdünnungsreihe zwischen 10^{-2} - 10^{-8} angesetzt. Von jeder Verdünnungsstufe wurden je 0,05 ml mit einer sterilen Pipette auf 3 Trypticaseagarplatten (2) aufgetragen und mit einem vorher in Alkohol getauchten, dann abgeflamten Glasstab gleichmäßig ausgestrichen und 24 Std. bei

(1) Spectronic, Bausch and Lomb

(2) Yeast-Trypticase-agar mit 0,1% Zuckerzusatz

37°C bebrütet. Die Anzahl der sich gebildeten P. multocida-Kolonien wurden mit dem Zählgerät (1) bestimmt. Die ermittelten Kolonienzahlen sowie die spektralphotometrische Extinktion wurden graphisch dargestellt (Abb.1).

3.25 Reinheitskontrolle der Kulturen

Nach der Bebrütung bei 37°C für 72 Std. wurde von jeder Kultur eine Gramfärbung angefertigt und die Reinheit der Kultur auf Schafblutagar geprüft. Außerdem wurden die Kulturen auf Indolbildung und Vergärung von Glucose, Lactose und Saccharose getestet.

3.26 Gewinnung der P. multocida Proteinfraktionen

Nach Bebrütung bei 37°C für 72 Std. wurden die Kulturen in sterilen Zentrifugenbechern 40 Min. bei 12100 g zentrifugiert (2). Der Kulturüberstand jedes Stammes wurde in sterile 600-ml-Plastikbecher umgefüllt.

-
- (1) Placont-Zählgerät, Boskamp
 - (2) Superspeed RC2B Zentrifuge, Sorvall,
Newtown/Connecticut USA

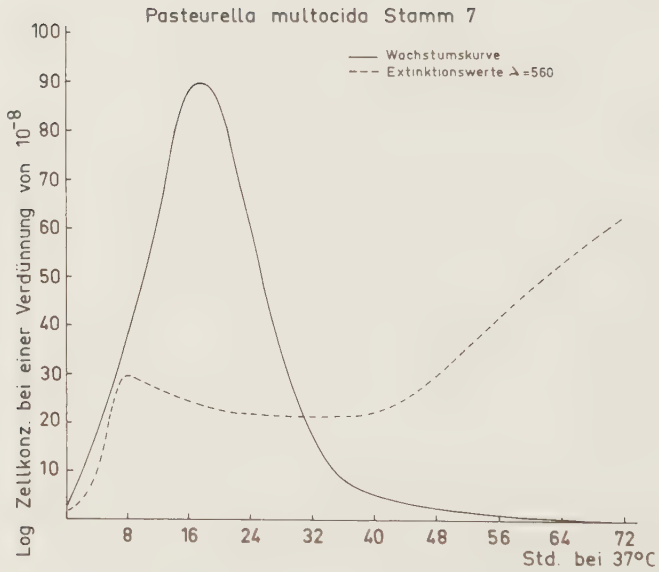


Abbildung 1:

Wachstumskurve von Pasteurella multocida Stamm 7

3.261 Metaphosphorsäure (HPO_3)_n-Fällung

Nach Zusatz von 50 g (HPO_3)_n zu dem 500 ml zentrifugierten Kulturüberstand wurde die Mischung 24 Std. bei 4°C aufbewahrt und anschließend bei 16300 g 20 Min. zentrifugiert. Das Sediment wurde 3-mal in 0,1 M Citratpuffer bei pH 3,6 gewaschen. Der weitere Vorgang zur Proteingewinnung wurde nach BRÜCKLER et al.⁶ durchgeführt. Das Sediment wurde in 2 ml 0,05 M Tris- 0,38 M - Glykokoll-Puffer, pH 8,5, gelöst. Ungelöste Partikel wurden durch Zentrifugieren (1) 20 Min. bei 48200 g entfernt. Der Überstand wurde in sterilen Schraubröhrchen aufbewahrt. Unbeimpfte BB wurde zur Kontrolle ebenfalls mit 50 g (HPO_3)_n behandelt.

3.262 Salzsäure (HCl)-Fällung

Der zentrifugierte Überstand von Kulturen, die 12, 18, 24, 48 und 72 Std. bebrütet worden waren, wurde erst mit 6 n HCl und dann mit 2 n HCl auf pH 3,6 gebracht (2) und 24 Std. bei 4°C aufbewahrt. Das entstandene Präzipitat wurde bei 12100 g 10 Min. zentrifugiert. Das Sediment wurde 3-mal in 0,1 M

(1) Superspeed RC2B, Sorvall, Newtown/Connecticut, USA

(2) Radiometer Copenhagen Typ pH M 26

Citratpuffer bei pH 3,6 gewaschen. Die weitere Gewinnung der Proteine wurde nach der Methode von BRÜCKLER et al.⁶ vorgenommen. Unbeimpfte BB wurde zur Kontrolle ebenfalls auf pH 3,6 eingestellt.

3.263 Proteinbestimmung

Die Proteinmenge, die von einem Stamm von P. multocida gewonnen worden war, wurde mit 0,14 M NaCl 1:10, 1:20, 1:50 und 1:100 verdünnt.

Die Proteinbestimmung wurde nach der Methode von LOWRY et al.²⁵ vorgenommen. Die Messung wurde spektralphotometrisch (1) bei 560 nm durchgeführt.

3.27 Vertikale Polyacrylamidgel-Disk-Elektrophorese

Die vertikale Polyacrylamidgel-Disk-Elektrophorese wurde im wesentlichen nach DAVIS¹⁶, SCHMITT³⁶ und BRÜCKLER et al.⁶ durchgeführt.

3.271 Disk-Elektrophorese-Stammlösungen

Für die Auftrennung der P. multocida-Proteine mit Hilfe der Disk-Elektrophorese wurden Gele aus verschiedenen Stammlösungen hergestellt.³⁶

(1) Zeiß Spektral-Photometer (M4:Q,III,49080)
Carl Zeiß, Oberkochen/Württemberg, Deutschland

Diese Stammlösungen setzten sich zusammen:

- 1) Trenngel-Monomergemisch

Acrylamid	28,0	g
NN'-Methylenbisacrylamid	0,735	g
aqua bidest.	ad 100,0	ml
- 2) Trenngel-Puffer pH 8,9

Trishydroxymethylaminomethan	18,3	g
1 n HCl	24,0	ml
Tetramethyläthylendiamin	0,115	ml
aqua bidest.	ad 100,0	ml
- 3) Katalysator

Ammoniumperoxydisulfat	0,14	g
aqua bidest.	ad 100,0	ml
- 4) Sammel- und Trenngel-Monomergemisch

Acrylamid	10,0	g
NN'-Methylenbisacrylamid	2,5	g
aqua bidest.	ad 100,0	ml
- 5) Sammel- und Probengelpuffer pH 6,7

Trishydroxymethylaminomethan	2,89	g
1 n HCl	24,0	ml
Tetramethyläthylendiamin	0,23	ml
aqua bidest.	ad 100,0	ml
- 6) Photokatalysator

Riboflavin	2,0	mg
aqua bidest.	ad 100,0	ml

Die Stammlösungen wurden unterschiedlich aufbewahrt. Grundsätzlich befanden sich alle in braunen 100-ml-Flaschen, Lösungen 1, 2, 4 und 5 bei Zimmertemperatur, Lösung 3 im Kühlschrank. Die Riboflavin-Photokatalysator-Lösung wurde zusätzlich mit schwarzem Papier gegen Licht geschützt.

Als Elektrodenpuffer wurde eine 0,5 M Tris-0,38 M - Glykokoll-Lösung mit einem pH von 8,5 benutzt:

Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	6,0 g
Glykokoll	28,8 g
aqua dest.	ad 1000 ml

Die Farblösung für die Gelsäulchen bestand aus:

Amidoschwarz 10 B	0,2 g
Essigsäure 12 %	45,0 ml
Na-acetat-Lösung 1,6 %	45,0 ml
Glycerin	10,0 ml

3.272 Apparaturen

Die Apparaturzusammenstellung erfolgte nach MAURER²⁶. Zur Herstellung der Gelsäulchen wurden alkaliarme Glasröhrchen mit einem Durchmesser von 5 mm und einer Länge von 110 mm benutzt.

Die beiden Elektrodengefäße wurden aus 600-ml-Plastik-Bechern hergestellt. In den Boden des oberen Gefäßes wurden randständig Löcher in gleichem Abstand voneinander mit einem Durchmesser von 7 mm gebohrt. Diese wurden mit einem Gummiring ausgekleidet.

Der Deckel dieses Gefäßes war in der Mitte durch die Kathode durchbohrt, die aus einem durch ein 150 mm langes Glasröhrchen geschützten Platindraht bestand. Etwa 10 mm Platindraht überragte das Glasröhrchen am unteren Ende. Die Anode entsprach in ihrem Aufbau der Kathode und befand sich zentral am Boden des unteren Gefäßes.

Abb. 2 veranschaulicht den Aufbau der Apparatur.

Außerdem wurden folgende Hilfsgeräte angewendet: Eine 30-ml- und eine 10-ml-Spritze, eine Tuberkulinspritze, eine 18 G Kanüle, mit einem dünnen Polyäthylenschlauch von 0,5 mm Durchmesser, eine stumpfgeschliffene 23er und eine ebenso geschliffene Tuberkulinspritzenkanüle, eine 100-Watt-UV-Lampe, ein Stativ, 2 Farbtröge und 20 Gummistöpsel mit einer zentralen Vertiefung, vier 10-ml-Pipetten, eine 5-ml-Pipette, und zwei 100-ml-Erlenmeyerkolben.

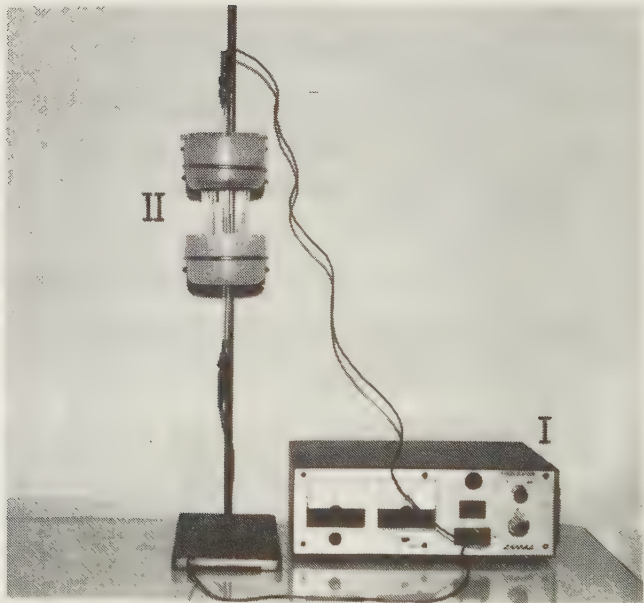


Abbildung 2:
Diskelektrophoretische Apparatur
I Gleichspannungsspeisegerät
II Puffergefäße mit Elektroden

3.273 Herstellung der Gelsäulchen

Die neuen Glasröhrchen wurden mit 10%iger Dichromschwefelsäure gereinigt, mit destilliertem Wasser gründlich gespült und getrocknet. Die Glasröhrchen wurden senkrecht in die Gummistöpsel gedreht.

Anschließend wurde das Trenngel hergestellt, indem je 10 ml Stammlösung 1, 2 und destilliertes Wasser und 20 ml Stammlösung 3 in einem 100-ml-Erlenmeyerkolben durch vorsichtiges Schwenken gut durchmischt wurden. Diese Menge reichte aus für die Beschickung von 16 Glasröhrchen.

Die Sammelgel- bzw. Probengelherstellung schloß sich an. Je 3 ml Stammlösung 4 und 5, 4 ml Stammlösung 6 wurden in einem Reagenzglas gemischt und im Dunkeln aufbewahrt.

Das 5,75%ige Trenngelgemisch wurde in die 30-ml-Spritze mit aufgesetzter 18 G Kanüle gefüllt und über den angeschlossenen Polyäthylenschlauch in die Glasröhrchen bis zur Höhe von 100 mm, unter Vermeidung von Blasenbildung, gegeben. Die Polymerisation des Trenngels verlief unter Vermeidung von Luftkontakt. Dies wurde durch vorsichtige Übersichtung mit aqua dest. erreicht. Die Polymerisation dauerte 30 - 40 Min.. Danach wurde das

aqua dest. abgeschüttelt und in jedes Röhrchen 0,2 ml Sammelgel mit Hilfe der Tuberkulinspritze gefüllt und ebenfalls mit aqua dest. überschichtet. Die durch Riboflavin induzierte Polymerisation des Sammelgels verlief unter der 100-Watt-UV-Lampe. Der Vorgang dauerte 20 - 30 Min.. Das aqua dest. wurde entfernt und jedes Röhrchen mit einer Mischung aus Sammelgel und 0,05 bis 0,3 ml Proteinprobe bis zum Rand gefüllt. Diese Mischung wurde als Proben-gel bezeichnet. Die Polymerisation dieser Mischung erfolgte unter der UV-Lampe innerhalb von 30 - 40 Min.. Es wurden grundsätzlich nur schlierenfreie Gelsäulchen verwendet.

3.274 Ablauf der Disk-Elektrophorese

Nach der Polymerisation des Probengels wurden die gefüllten Glasröhrchen vorsichtig von den Gummistöpseln gelöst und in die Bohrlöcher des oberen Gefäßes hineingedreht. Beide Puffergefäße wurden an dem Stativ befestigt und die Glasröhrchen senkrecht ausgerichtet. In die beiden Puffergefäße wurden jeweils 400 ml einer vorgekühlten Gebrauchs-Pufferlösung (mit aqua dest. 1:5 verdünnte Pufferstammlösung) gegeben. Eventuelle Luftblasen in dem Röhrchen wurden durch leichtes Klopfen entfernt.

Um die Pufferfront und damit die Wanderung sichtbar zu machen, wurden zu den 400 ml Pufferlösung des oberen Gefäßes 0,5 ml einer 0,001%igen wässrigen Bromphenolblaulösung hinzugefügt. Das untere Gefäß wurde dem oberen so weit genähert, daß die Gelsäulchen 10 - 20 mm in die Pufferlösung tauchten. Nun wurde der Deckel mit der Kathode auf das obere Puffergefäß gesetzt und die Elektroden mit einem Konstantstromgerät (1), das 4 mA pro Röhrchen lieferte, verbunden. Ein gleichzeitig vorbereiteter zweiter Röhrchensatz wurde parallel geschaltet.

Die elektrophoretische Trennung war beendet, wenn sich die Pufferfront etwa 10 mm vor dem unteren Röhrchenrand befand. Die Wanderungszeit betrug 90 - 100 Min.. Während der Disk-Elektrophorese bewegte sich die Temperatur der Pufferlösung zwischen 24 und 26°C.

3.275 Färbung und Entfärbung der Gelsäulchen

Die Glasröhrchen wurden aus dem Puffergefäß herausgedreht und vorübergehend in Eiswasser gelegt. Inzwischen wurde eine 10-ml-Spritze mit stumpfgeschliffener 23er Kanüle voll Eiswasser gezogen.

(1) Gleichspannungsspeisegerät,
Camag, Muttenz/Schweiz

Unter gleichzeitigem Injizieren von Wasser wurde die Kanüle zwischen Glasröhrcheninnenwand und Gelsäulchen geschoben. Während dieses Vorgangs wurde das Glasröhrchen langsam stetig gedreht. Die so von der Glaswand gelösten Gelsäulchen wurden in einen Trog gelegt und mit Farblösung bedeckt. Die Färbung dauerte 90 Min..

Die Gelsäulchen wurden einzeln in fortlaufend beschriftete Reagenzgläser getan, diese wurden mit 10%iger Essigsäure aufgefüllt, mit einem Gummistopfen verschlossen und horizontal auf eine Wippe gelegt. Die Essigsäure nahm die überschüssige Farbe auf und wurde deshalb anfangs stündlich, später alle 6 - 8 Std. gewechselt. Die Entfärbung der Gelsäulchen dauerte 72 Std..

3.276 Auswertung der Banden

Die mit Amidoschwarz angefärbten Proteinfractionen zeigten sich nach Entfärbung der Gelsäulchen als blaue Banden. Die Auswertung dieser Banden und die Berechnung deren relativer Wanderungsgeschwindigkeiten erfolgte nach der Methode von BRÜCKLER und BLOBEL⁷.

4.0 Ergebnisse

4.1 Identifizierung der P. multocida-Stämme

Alle untersuchten P. multocida-Stämme waren Gram-negativ. Die Keime waren vorwiegend ovoid. Alle untersuchten Stämme außer 46 A bildeten Indol.

Kein Stamm verflüssigte Gelatine oder brachte Lackmusmilch zur Gerinnung. Die Methylrot-Reaktion war bei allen Stämmen negativ. Alle Stämme spalteten Glukose, Saccharose, Galaktose, aber nicht Laktose, Dulcit und Adonit.

4.2 Medien-Vergleich

Die Medien ergaben Unterschiede bezüglich des Bakterienwachstums. In LO₃ (1) war die logarithmische Phase schon nach 10 Std. beendet, in BB (2) dagegen erst nach 14 Std. (Abb. 3). Maximales Wachstum wurde jedoch nach 72 Std. in BB erzielt.

4.3 Bakterienwachstum

Das Wachstum von 14 Stämmen wurde analysiert. Eine repräsentative Wachstumskurve wurde in Abb. 3 dargestellt

-
- (1) Casein Casein-Yeast Medium,
modifiziert nach WENK³⁹
(2) Albimi Laboratories, New York, USA

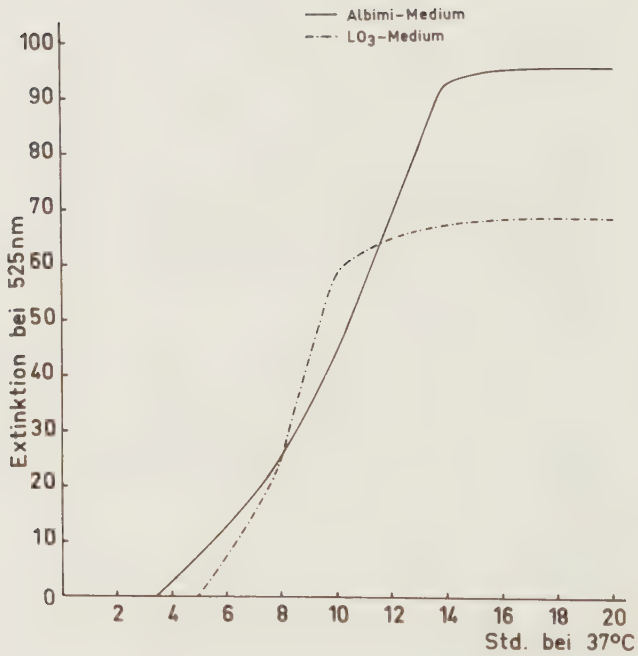


Abbildung 3:

Wachstum von Pasteurella multocida, Stamm 3
in Albimi- und LO₃-Medium

4.4 Säure-Fällung

Das unbeimpfte Kulturmedium ergab bei Zusatz von 50 g Metaphosphorsäure, bzw. bei Einstellen mit HCl auf pH 3,6 kein Präzipitat. Demzufolge könnte angenommen werden, daß die aus den Kulturüberständen durch Säurefällung gewonnenen Substanzen von P. multocida gebildet worden waren. Der Kulturüberstand von 12, 18 und 24 Std. bebrüteten P. multocida wies sowohl unter Zugabe von HCl bei pH 3,6 als auch von 50 g $(\text{HPO}_3)_n$ nur ein geringes Präzipitat auf. Erst nach Bebrütung der Kulturen für 48 Std. war ein deutliches und nach Bebrütung für 72 Std. ein starkes Präzipitat feststellbar. Mit der Folin-Reaktion wurden die Proben für die Disk-Elektrophorese auf 0,64 mg Protein eingestellt.

4.5 Diskelektrophoretische Auswertung von P. multocida-Protein

Eine diskelektrophoretische Analyse der mit $(\text{HPO}_3)_n$ gefällten Proteinfraktionen war nicht möglich, da auf dem Gelsäulchen keine Banden zu erkennen waren. Protein-Banden erschienen bei Kulturen die nach Bebrütung von 48 Std. oder länger mit HCl ausgefällt

worden waren. Diese Banden waren allerdings optisch (1) bei den 48-Std.-Kulturen nicht immer erfaßbar. Deshalb wurden die Kulturen 72 Std. bei 37°C bebrütet und die Proteine aus dem Kulturüberstand mit HCl bei pH 3,6 ausgefällt.

Die Analysen der Proteine mit der vertikalen Polyacrylamidgel-Disk-Elektrophorese ergab eine Anzahl von Proteinbanden. Bei allen 92 untersuchten Stämmen kamen diese Banden markant hauptsächlich im mittleren Wanderungsbereich bei 62, 60, 54, 49, 44 und 37 vor. Für die markanten Proteinbanden ergab sich eine Standardabweichung von ± 1 ($= \pm 1 \%$).

4.6 Reproduzierbarkeit der Diskelektrophorese-Ergebnisse

Von jedem Stamm wurden 4 bis 6 Diskelektrophoresen durchgeführt und die einzelnen Elektrophorogramme verglichen. Bei allen 92 untersuchten Stämmen ließen sich die diskelektrophoretischen Ergebnisse reproduzieren.

(1) Analytrol Modell RB mit vorgeschaltetem microzone scanning attachment, Beckman Instruments, Inc., Palo-Alto, Calif., USA

4.7 Weitere Kombinationstypen

Die von BRÜCKLER et al.⁶ beschriebenen dominierenden Banden kamen bei allen untersuchten Stämmen vor. Von den 92 untersuchten Stämmen von P. multocida, ließen sich aber nach BRÜCKLER et al.⁶ nur 24 Stämme eindeutig einordnen; und zwar 17 Stämme in die Gruppe IV, ein Stamm in die Gruppe I, ein Stamm in die Gruppe II und 5 Stämme in die Gruppe III. Die Banden der restlichen 68 P. multocida-Stämme wiesen zusätzliche Kombinationen auf. Deshalb mußte das Schema von BRÜCKLER et al.⁶ auf 14 diskelektrophoretische Kombinationstypen erweitert werden (siehe Anhang). Alle untersuchten P. multocida-Stämme hatten die Banden 54 und 60. Zusätzlich traten zwischen 87 und 81 bei 48 Stämmen, zwischen 72 und 70 bei 15 Stämmen, zwischen 80 und 75 bei 21 Stämmen, zwischen 33 und 30 bei 16 Stämmen und zwischen 29 und 24 bei 25 Stämmen Banden auf, die aber nicht weiter ausgewertet wurden, da sie außerhalb des konstanten Wanderungsbereiches lagen.

4.8 Vergleich der diskelektrophoretischen Analyse mit serologischen Typisierungsergebnissen

Von den 92 untersuchten P. multocida-Stämmen waren 42 bereits nach CARTER¹⁰ typisiert worden. Bei dem Vergleich stellte sich heraus, daß die 21 Stämme

von der serologischen Gruppe A 9 diskelektrophoretische Kombinationstypen (1, 2, 3, 7, 9, 10, 11, 12, 14), die 5 Stämme der serologischen Gruppe B 4 diskelektrophoretische Kombinationstypen (2, 3, 5, 12), die 12 Stämme der serologischen Gruppe D 6 diskelektrophoretische Kombinationstypen (2, 6, 11, 12, 13, 14) und die 4 Stämme der serologischen Gruppe E 3 diskelektrophoretische Kombinationstypen (2, 10, 11) aufwiesen (Tab. 3). Die elektrophoretische Auftrennung der Proteinbanden zeigte, daß die Gruppen A und E relativ mehr Banden im mittleren Wanderungsbereich aufwiesen, daß aber keine Beziehung bestand zwischen der serologischen Gruppendifferenzierung nach CARTER und den Ergebnissen der Diskelektrophorese.

Anhand der vorliegenden Stämme und ihrer Herkunft wurde weiter untersucht, ob die diskelektrophoretischen Kombinationstypen eine bestimmte Wirtsspezifizität andeuten könnten. In dieser Absicht wurde die Tab. 4 zusammengestellt. Es ließ sich aber kein eindeutiger Zusammenhang zwischen den diskelektrophoretischen Kombinationstypen und einer bestimmten Tierart an den zur Verfügung stehenden Stämmen ableiten.

Tabelle 3:

Diskelektrophoretische Kombinationstypen bei
42 serologisch charakterisierten Pasteurella
multocida-Stämmen

Diskelektrophoretische Kombinations- typen	Anzahl der <u>Pasteurella multocida</u> - Stämme der serologischen Gruppen			
	A	B	D	E
1	1	-	-	-
2	3	1	1	2
3	1	1	-	-
4	-	-	-	-
5	-	2	-	-
6	-	-	5	-
7	1	-	-	-
8	-	-	-	-
9	2	-	-	-
10	3	-	-	1
11	3	-	1	1
12	1	1	1	-
13	-	-	3	-
14	6	-	1	-

Tabelle 4:

Vorkommen und Krankheitsbilder von P. multocida-Kombinationstypen

Stamm Nr.	Diskelektro- phoretische Kombinations- typen	Serol. Gruppen (CARTER)	Tierarten	Krankheitsbilder	Land
8	1	A	Geflügel	Geflügelcholera	Vietnam
11	2	E	Rind	Rinderseptikämie	Kongo
14	2	NT*	Schaf	Schafpneumonie	Kenia
18	2	"	Geflügel	Geflügelcholera	CSR
26	2	"	Geflügel	Geflügelcholera	Formosa
42	2	"	Kaninchen	Kaninchenrhinitis	Deutschl.
39	2	A	Ochse	-	-
61	2	D	Schwein	Schweineseptikämie	Frankr.
72	2	B	Büffel	-	Senegal
74	2	E	Zebu	-	-
89	2	NT*	P 61	-	-
95	2	"	SP 124	-	-
98	2	"	Schwein	Schweinepneumonie	Frankr.
101	2	"	Geflügel	-	Deutschl.

* nicht typisiert

Fortsetzung Tabelle 4:

102	2	NT*	Geflügel	-	Deutschl.
106	2	"	Meerschw.	-	Deutschl.
2	3	A	Rind	Impfstamm	Indien
9	5	A	Rind	Rinderseptikämie	Philippinen
15	3	NT*	Rind	Rinderpneumonie	Philippinen
34	3	"	Schaf	-	USA
83	3	"	Mensch	-	USA
105	3	"	Geflügel	-	Deutschl.
3	4	"	Geflügel	Geflügelcholera	CSR
12	5	B	Rind	Rindwunde	Australien
17	5	NT*	Rind	-	Afrika
30	5	"	Eichhörn.	-	USA
31	5	"	Schwein	Schweinepneumonie	Formosa
32	5	"	1297	-	-
40	5	B	Büffel	-	-
94	5	NT*	Poona	-	-

* nicht typisiert

Fortsetzung Tabelle 4:

57	6	D	Hase	Hasenpneumonie	Frankr.
59	6	D	Schwein	Schweinepneumonie	Frankr.
62	6	D	Pferd	Pferdwindinfekt.	Frankr.
69	6	D	Hase	-	Frankr.
70	6	D	Geflügel	-	Frankr.
75	6	NT*	Kaninchen	-	Deutschl.
76	6	"	Kaninchen	-	Deutschl.
84	6	"	Mensch	-	USA
85	6	"	Bussard	-	-
99	6	"	Schaf	-	England
3	6	"	Hund	-	USA
22	6	"	Mensch	-	CSR
7	7	A	Schwein	Schweinepneumonie	Frankr.
87	8	NT*	2257	-	-
10	9	A	Geflügel	Geflügelcholera	USA
27	9	NT*	Geflügel	Geflügelcholera	Vietnam

* nicht typisiert

Fortsetzung Tabelle 4:

54	9	A	Schwein	Schweinepneumonie	Frankr.
97	9	NT*	39 Bx	-	-
103	9	"	5162	-	Deutschl.
24	10	"	Ratte	-	Kenia
51	10	A	Geflügel	Geflügelcoryza	Frankr.
67	10	A	Schaf	-	Frankr.
68	10	A	Ente	Entenpneumonie	Frankr.
73	10	E	Zebu	-	Kamerun
79	10	NT*	Mensch	-	USA
80	10	"	Mensch	-	USA
5	11	E	Rind	-	Kongo
23	11	NT*	Gans	-	Japan
57	11	"	Geflügel	Geflügelcholera	Burma
44	11	A	Schaf	-	Frankr.
48	11	A	Schwein	Schweinepneumonie	Frankr.
49	11	A	Geflügel	Geflügel CRD	Frankr.

* nicht typisiert

Fortsetzung Tabelle 4:

1	12	A	Kaninchen	-	Frankr.
4	12	D	Schwein	Schweinepneumonie	Japan
71	12	B	Büffel	-	Kambodscha
81	12	NT*	Mensch	-	USA
90	12	"	S 573	-	-
16	13	"	Schwein	-	Polen
25	13	"	Pferd	-	Polen
63	13	D	Geflügel	Geflügelcholera	Frankr.
64	13	D	Rind	-	Frankr.
65	13	D	Ziege	Ziegenpneumonie	Frankr.
82	13	NT*	Mensch	-	USA
96	13	"	39 Bu	-	-
108	13	"	Schwein	-	Deutschl.
110	13	"	Kalb	-	Schweiz

* nicht typisiert

Fortsetzung Tabelle 4:

21	14	NT*	Rind	-	Polen
29	14	"	Katze	-	Japan
35	14	"	Rind	-	Nigeria
36	14	"	Geflügel	Geflügelcholera	Polen
41	14	A	Geflügel	Geflügelcholera	Pakistan
45	14	A	Ziege	-	Frankr.
46	14	A	Hammel	-	Frankr.
47	14	A	Schwein	Schweinepneumonie	Frankr.
52	14	A	Hase	-	Frankr.
53	14	A	-	-	Frankr.
58	14	D	Schwein	Schweinepneumonie	Frankr.
77	14	NT*	Mensch	Darmwunde	USA
78	14	"	Mensch	Hundbißwunde	USA
86	14	"	2611	-	-
92	14	"	2/134	-	-
93	14	"	196/64	-	-
100	14	"	Kaninchen	-	Deutschl.

* nicht typisiert

5.0 Diskussion

Mit Ausnahme von Stamm 46, Gruppe A, der eine negative Indol-Reaktion zeigte, besaßen alle übrigen untersuchten Stämme die typischen morphologischen und biochemischen Eigenschaften von P. multocida. Stamm 46 wurde trotzdem in die Untersuchungen eingeschlossen, da er von CARTER in die serologische Gruppe A von P. multocida eingeordnet worden war. LITTLE und LYON²³ versuchten mit dem Objektträger-Agglutinationstest P. multocida zu typisieren. Diese Methode erwies sich als unzulänglich, da die Stämme, die eine Kapsel aufwiesen, nicht zu agglutininieren waren. Eine serologische Typisierung von P. multocida-Stämmen wurde dann im Mäuseschutztest von ROBERTS³⁴, HUDSON¹⁹ und ALFONSON et al.¹ durchgeführt. Mit dieser Methode wurden allerdings nur mäuse-pathogene Stämme erfaßt. CARTER⁹ analysierte mit dem indirekten Hämagglutinationstest Kapselantigene von P. multocida und unterschied 4 Serotypen. BAIN⁵ extrahierte Kapselsubstanzen nach der Methode von AMIES². Diese verloren ihre immunogene Mäuseschutzeigenschaft nach Abtrennung der Proteine. Daraus wurde geschlossen, daß nicht nur Lipopolysaccharide, sondern auch Proteine von P. multocida immunogene Bedeutung haben. Eine Be-

stätigung dieser Annahme wurde durch die Forschungsergebnisse von KNOX und BAIN²¹, PRINCE und SMITH³³ und KUNWAR et al.²² erbracht. DHANDA¹⁷ benutzte gereinigte Proteinfractionen von P. multocida zur aktiven Immunisierung von Mäusen, Rindern und Büffeln gegen Pasteurellose.

NAMIOKA und MURATA^{27,28} untersuchten die somatischen Antigene von P. multocida und stellten innerhalb der Carter-Serotypen A, B und D serologische Untergruppen fest. CARTER¹³ berücksichtigte diese Untersuchungsergebnisse und schlug vor, die bisher als Carter-Typen A, B, D und E als Gruppen zu bezeichnen. Bei allen Methoden der Typisierung von P. multocida wurden einerseits die oberflächlichen Lipopolysaccharide (CARTER⁸, PERREAU³²) und andererseits die somatischen Antigene (NAMIOKA und MURATA^{27,28}, NAMIOKA und BRUNER²⁹) benutzt.

BRÜCKLER et al.⁶ analysierten die Proteine der P. multocida mit der vertikalen Polyacrylamidgel-Disk-Elektrophorese, um P. multocida-Stämme aufgrund ihrer Proteine zu charakterisieren und zu typisieren. Die diskelektrophoretischen Kombinationstypen erwiesen sich in dieser Arbeit als reproduzierbar; die Kombinationstypen mußten aber erweitert werden um möglichst alle untersuchten Stämme zu erfassen.

Die HCl-Fällung bei pH 3,6 brachte bei Bebrütungszeiten bis 48 Std. kein auswertbares Präzipitat. Erst nach einer Bebrütungszeit von 72 Std. wurde ein für die Disk-Elektrophorese geeignetes Präzipitat gewonnen. Es zeigte sich jedoch, daß bereits nach 24 Std. Bebrütung die Absterbphase deutlich eingesetzt hatte. Nach 72 Std. Bebrütung wuchsen von 0,01 ml Bakteriensuspension auf einer Kontroll-Blutagarplatte nur noch 2 - 3 P. multocida-Kolonien. Somit bestand das Präzipitat nach 72 Std. Bebrütungszeit wahrscheinlich in erster Linie aus Proteinen und anderen Substanzen, die durch Zellyse freigeworden waren.

Im mittleren Wanderungsbereich zeigten sich markante Proteinbanden bei 62, 60, 54, 49, 44 und 37. Zu ähnlichen Ergebnissen waren schon BRÜCKLER et al.⁶ gekommen. Diese Autoren hatten die 28 von ihnen untersuchten Stämme in 4 Kombinationen eingeteilt (I, II, III, IV). Diese Einteilung war von CARTERS serologischen Typen vollkommen unabhängig.

Bei den 92 hier untersuchten Stämmen kamen dieselben Banden wie bei BRÜCKLER et al.⁶ vor, aber in 14 Kombinationen. Diese Kombinationen könnten als diskelektrophoretische Kombinations-

typen bezeichnet werden. Von den 92 Stämmen ließen sich nur 24 in das Schema von BRÜCKLER et al.⁶ einordnen. Für die restlichen 68 Stämme mußten weitere 10 Kombinationen berücksichtigt werden. Allen untersuchten P. multocida-Stämmen waren die Banden 54 und 60 gemeinsam, die als artspezifisch angesehen werden konnten. NAMIOKA und MURATA²⁹ stellten bei 134 untersuchten Stämmen ebenfalls allen Stämmen gemeinsame Antigene fest.

In der vorliegenden Arbeit wurden 21 der Carter-Gruppe A zugeordnete P. multocida-Stämme in 9 diskelektrophoretische Kombinationstypen unterteilt, 5 Stämme der Gruppe B in 4, 12 Stämme der Gruppe D in 6 und 4 Stämme der Gruppe E in 3. Diese Ergebnisse bestätigen die von NAMIOKA und MURATA²⁷ aufgestellte Behauptung, daß innerhalb der serologischen Typen von CARTER Untertypen existieren.

Mit der Disk-Elektrophorese konnte man die Gruppen A, B und D eindeutig charakterisieren. Sechs diskelektrophoretische Kombinationstypen waren der Gruppe A und D gemeinsam. Das konnte auch die Kreuzreaktion zwischen diesen Gruppen erklären. Die 3 Kombinationen der Gruppe E waren

identisch mit 3 Kombinationen der Gruppe A. Der diskelektrophoretische Kombinationstyp 2 war bei sämtlichen Gruppen vorhanden. Das könnte bedeuten, daß innerhalb der Gruppen eine gewisse Antigenverwandtschaft vorlag.

Die Ergebnisse der diskelektrophoretischen Analyse der P. multocida-Proteine haben gezeigt, daß diese Methode für die Charakterisierung der P. multocida-Stämme und dadurch ihre Typisierung geeignet war.

Nachdem die Proteinfractionen der P. multocida elektrophoretisch aufgetrennt worden waren, sollte die nächste Aufgabe darin bestehen, diese Proteinfractionen weiter zu identifizieren, insbesondere ihre Immunisierungseigenschaften zu klären. Es wäre außerdem wichtig, die Beziehung zwischen den diskelektrophoretischen Typen und den somatischen Gruppen festzustellen. In dieser Arbeit wurden nur Proteine erfaßt, die sich bei pH 3,6 ausfällen ließen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte im Polyacrylamid-Trenngel bei pH 6,8. Zu einer erfolgreichen Bekämpfung der Pasteurellose wäre eine genaue Kenntnis der gesamten Antigen-Struktur erforderlich. Eine

eingehende Analyse der Lipopolysaccharide wurde bereits von SMITH und PRINGLE³⁶, BAXI⁵, LONDON und YAW²⁶, PERREAU und PETIT³² durchgeführt. Die Disk-Elektrophorese bietet sich als Methode zur Analyse der Proteine von P. multocida an.

6.0 Zusammenfassung

Zweiundneunzig Pasteurella multocida-Stämme, die zum Teil vorher serologisch typisiert worden waren, wurden diskelektrophoretisch untersucht. Dafür wurden die Pasteurella multocida-Stämme 72 Std. bei 37°C in einem flüssigen Nährmedium gezüchtet. Danach wurden die Bakterien abzentrifugiert. Aus dem Kulturüberstand wurden Pasteurella multocida-Proteine mit Salzsäure bei einem pH von 3,6 ausgefällt. Die so isolierten Proteine wurden mit der vertikalen Polyacrylamidgel-Disk-Elektrophorese charakterisiert.

In Bestätigung der Ergebnisse von BRÜCKLER et al.⁶ ergaben sich reproduzierbare charakteristische Banden. Es waren 14 diskelektrophoretische Kombinationstypen erforderlich, um alle 92 untersuchten Stämme einzuordnen.

Die Ergebnisse der Polyacrylamidgel-Disk-Elektrophorese waren unabhängig von denen der serologischen Typisierung nach CARTER⁹.

Literaturverzeichnis

1. ALFONSO, J.C. Prophylaxis of Pasteurella multocida
MEIRELLES, M.L. infection
BAPTISTA, H.L. I. Immunological Identification of
 portuguese strain
 II. Formalised alum-precipitated
 vaccine
 III. Mouse assay of antipasteurellosis
 sera
 Bolm. pecuar 32, 7-19, 21-34, 35-41
 (1964) Zit. Vet. Bull. (Weybridge)
 36, 1682
2. AMIES, C.R. Brit. J. exp. Path. 32, 259 (1951)
3. BAIN, R.V.S. Studies on haemorrhagic septicaemia
 of Cattle. IV. A preliminary examina-
 tion of the antigens of Pasteurella
 multocida type I.
 Brit. Vet. J. 111, 492-498 (1955)
4. BAIN, R.V.S. Hemorrhagic septicemia. F.A.O.
 agriculture studies Nr. 62
 Food and Agriculture Organisation
 of the United Nations, Rome 1963
5. BAXI, K.K. Studien der Antigenstruktur von
 Pasteurella multocida
 Vet. Med. Diss. (Gießen) 1969
6. BRÜCKLER, J. Vertikale Polyacrylamidgel-Disk-
BAXI, K.K. Elektrophorese von Pasteurella
BLOBEL, H. multocida-Proteinen
 Zbl. Vet. Med. B, 17, 564-568 (1970)

7. BRÜCKLER, J. Vertikale Polyacrylamidgel-Disk-
BLOBEL, H. Elektrophorese von Staphylokokken-
Proteinen
Zbl. Bakt. Parasit. Infektion, Hyg.
I, Originale 213, 161-169 (1969/70)
8. CARTER, G.R. Isolation of capsular polysaccharides
ANNAU, E. from colonial variants of Pasteurella
multocida
Amer. J. Vet. Res. 14, 475-478 (1953)
9. CARTER, G.R. Studies on Pasteurella multocida.
I. A hemagglutination test for the
identification of serological types
Amer. J. Vet. Res. 16, 481-484 (1955)
10. CARTER, G.R. Failure of the agglutination test to
identify types of Pasteurella mul-
tocida
Nature (Lond.) 181, 1138 (1958)
11. CARTER, G.R. A serological study of the hemorrha-
BYRNE, J.L. gic septicemia Pasteurellae
Cornell Vet. 43, 223-230 (1953)
12. CARTER, G.R. A new serological type of Pasteurella
multocida from Central Africa
Vet. Rec. 73, 1052 (1961)
13. CARTER, G.R. Proposed modification of the serolo-
gical classification of Pasteurella
multocida
Vet. Rec. 75, 1264 (1963)
14. CARTER, G.R. Identification of antigenic charac-
teristics and colonial variants
Amer. J. Vet. Res. 18, 210-213 (1957)

15. CARTER, G.R. The type specific capsular antigen
of Pasteurella multocida
Canad. J. med. Sci. 30, 48-53 (1952)
16. DAVIS, B.J. Disc-Electrophoresis. II. Method and
application in human serum proteins
Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 404-427
(1964)
17. DHANDA, M.R. Immunological studies on Pasteurella
septica
IV Production of a high titer
hemorrhagic septicemia antiserum
Ind. J. Vet. Sci. 29, 47-56 (1959)
18. DHANDA, M.R. Purification and proprieties of the
soluble antigen of Pasteurella
septica typ I
Ind. J. Path. and Bacteriology 2,
59-67 (1960)
19. HUDSON, J.R. Prophylaxie de la pasteurellose
bovine. Note préliminaire sur la
classification des souches de
Pasteurella septica et sur un
vaccin vivant atténué
Bull. Off. int. Epiz. 42, 267-277
(1954)
20. KAWEH, M.
SOHRAB, V.
BAHAR-SEFAT, M. Bovine Pasteurellosis in Iran.
Methods of vaccination
Bull. Off. int. Epiz. 53, 196-202
(1960)

27. NAMIOKA, S. Serological studies on Pasteurella
MURATA, M. multocida
I. A simplified method for capsule
typing of the organism
II. Characteristics of somatic (O)
antigen of the organism
Cornell Vet. 51, 507-521 (1961)
III. O antigenic analysis of cultures
isolated from various animals
Cornell Vet. 51, 522-528 (1961)
28. NAMIOKA, S. Serological studies on Pasteurella
 multocida
V. Some epizootiological antigenic
analysis
Cornell Vet. 54, 520-534 (1964)
29. NAMIOKA, S. Serological studies on Pasteurella
BRUNER, D.W. multocida
IV. Type distribution of the
organism on the basis of their
capsule and O groups
Cornell Vet. 53, 41-53 (1963)
30. OCHII, Y. Studies on hemorrhagic septicemia
 organisms. Report V. Correlations
 between hemorrhagic septicemia
 organisms isolated from various
 animals
J. Jap. Soc. Vet. Sci. 12, 198-199
(1933)
31. PERRIAU, P. Contribution à l'Etude immunologique
 de Pasteurella multocida existence
 et importance d'un nouveau type
 agent de la septicémie hemorrhagique
 des bovidés africains
Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.
14, 245-256 (1961)

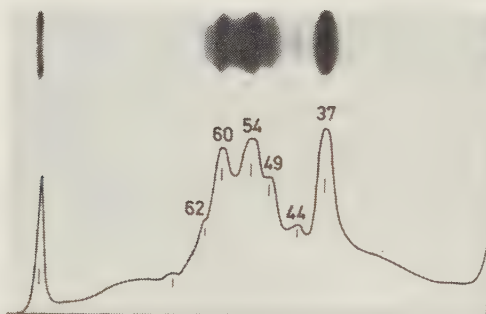
37. SMITH, J.E. Studies on Pasteurella septica
II. Some cultural and biochemical
properties of strains from different
host species
J. comp. Path. 68, 315-323 (1958)
38. Society of Manual of Microbiological Methods
American Bac- McGraw-Hill Book Company, Inc.
teriologists New York, Toronto, London (1957)
39. WENK, K. Leukozide Substanzen von Staphylo-
kokken
Vet. Med. Diss. Gießen (1969)

Anhang

Repräsentative diskelektrophoretische Kombinationstypen

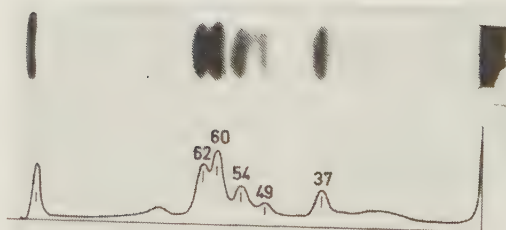
1

(62, 60, 54, 49, 44, 37)



2

(62, 60, 54, 49, 37)



⊕

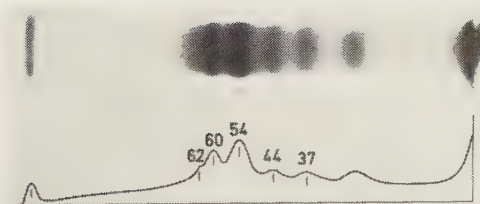
Pufferfront



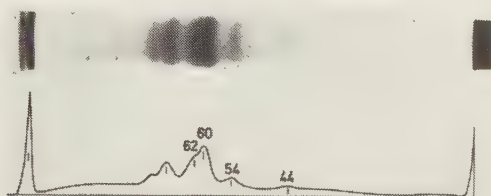
⊖

Startpunkt

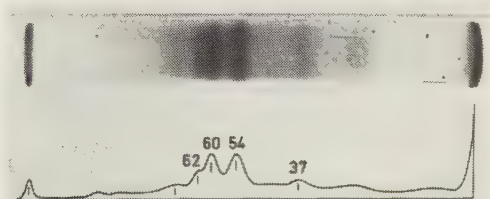
3
(62, 60, 54, 44, 37)



4
(62, 60, 54, 44)

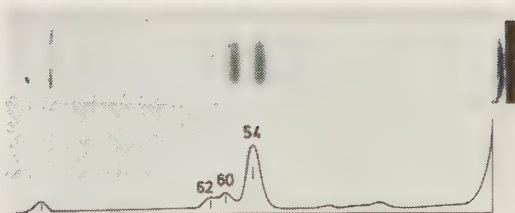


5
(62, 60, 54, 37)

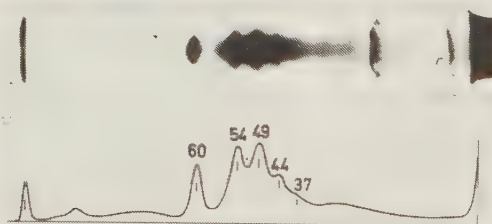


⊕ ← ⊖
Pufferfront Startpunkt

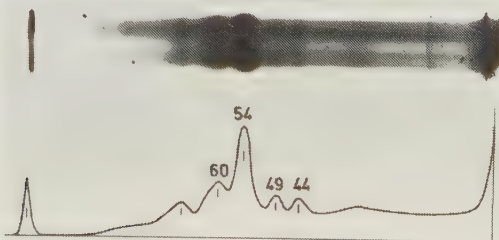
6
(62, 60, 54)



7
(60, 54, 49, 44, 37)

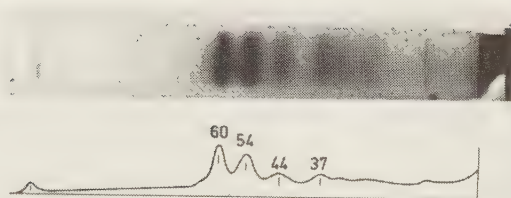


8
(60, 54, 49, 44)

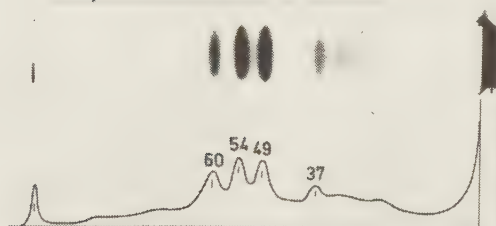


⊕ ← ⊖
Pufferfront Startpunkt

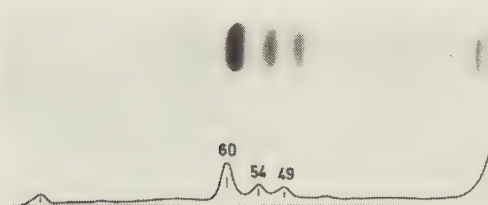
9
(60, 54, 44, 37)



10
(60, 54, 49, 37)



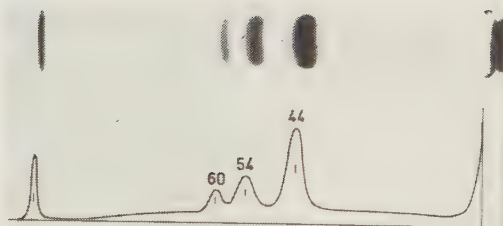
11
(60, 54, 49)



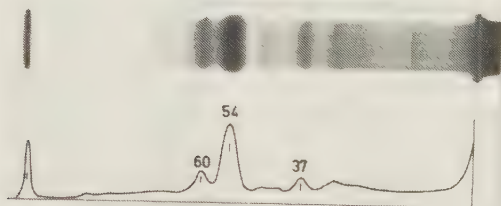
⊕
Pufferfront

← ⊖
Startpunkt

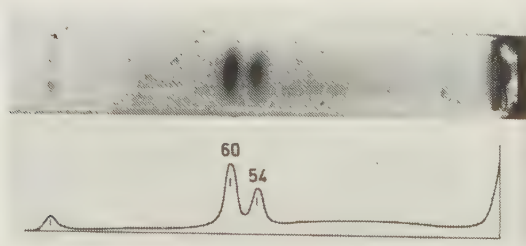
12
(60, 54, 44)



13
(60, 54, 37)



14
(64, 54)



⊕
Pufferfront

← ⊖
Startpunkt

Kombinationen der relativen Wanderungsgeschwindigkeit
von Proteinbanden von *Pasteurella multocida*

R _f -Wert	Kombinationstypen													
6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
62														
60														
54														
49														
44														
37														
Häufigkeit	1	15	6	1	7	12	1	1	6	6	6	5	9	16

R_f-Wert = relative Wanderungsgeschwindigkeit

Diskelektrophoretische Kombinationstypen

Am Ende dieser Arbeit habe ich die Freude,
Herrn Professor Dr. H. Blobel für die Über-
lassung des Themas und darüber hinaus für
die ständige Unterstützung sehr herzlich
zu danken.

Außerdem möchte ich Herrn Dr. J. Brückler
und Dr. W. Scharmann, Institut für Bakteriologie
und Immunologie, für ihre Hilfe meinen Dank
aussprechen.

Lebenslauf

Als Sohn von Adamou Makama und Hana Ousmane wurde ich, Adamou Laoualy, am 28.12.1942 in Kantché (Niger) geboren. Von 1948 - 1954 besuchte ich die Volksschule in Matamaye und Kantché. Nachdem ich die Abschlußprüfung bestanden hatte, wechselte ich auf das Gymnasium in Niamey über, wo ich den ersten Teil des französischen Abiturs absolvierte. Im November 1962 erhielt ich ein Stipendium vom Land Hessen. Während des Schuljahres 1962-63 besuchte ich das deutsch-französische Gymnasium in Berlin. Dort bestand ich den zweiten Teil des Abiturs.

Zum Wintersemester 1963-64 begann ich mit dem Studium der Veterinärmedizin an der Justus Liebig-Universität in Gießen, wo ich 1969 das Staatsexamen mit gut bestand. Im November 1969 erhielt ich die Approbation als Tierarzt. Anschließend war ich Doktorand am Institut für Bakteriologie und Immunologie der Veterinärmedizinischen Fakultät in Gießen.

